AC&T CIENTÍFICA®

Células-tronco Hematopoiéticas e seu Armazenamento em Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário

Flávia Cristina Tavernard de Oliveira[1], Paula Degani Ferreira da Silva[2]

1 – Biomédica Graduada pela UNICEUB. Brasília, DF.
2 – Biomédica Graduada pela Universidade de Uberaba – UNIUBE. Uberaba, MG.

Resumo
O sangue de cordão umbilical e placentário é uma fonte rica em células-tronco hematopoiéticas, as quais têm sido colocadas pelas pesquisas atuais como elementos de grande importância em procedimentos terapêuticos direcionados para diversas doenças hematológicas e oncogênicas, principalmente em pacientes que não apresentam doadores compatíveis. A criação de bancos de sangue especializados tornou-se necessária devido ao avanço da utilização destas células, justificando-se assim a sua criopreservação para uso autólogo ou heterólogo.
Palavras-chave: célula-tronco hematopoiética, banco de sangue de cordão umbilical e placentário.

Summary
The placentary and umbilical cord blood is a rich source of hematopoietic stem cells, which have been found by recent researchs as an important element in teraupetic procedures addressed to many **hematologic** and **oncogenic** diseases, mainly for pacients that do not have compatible donors. The opening of specialized cord blood banks became mandatory because of the recent use of these cells, justifying your cryopreservation to **autologic** or **heterologic** aplications.
Keywords: hematopoietic stem cell, blood bank of umbilical cord and placenta.

Introdução

Há alguns tipos de células com a capacidade de regeneração que funcionam como um sistema biológico de manutenção, com potencial para se transformar em vários tipos de células especializadas do corpo humano. Em teoria podem se dividir infinitamente para substituir outras. Essas células foram descobertas há mais de 20 anos e podem ser designadas como células-tronco, classificadas em células-tronco embrionárias e células-tronco hematopoiéticas (adultas), que são o nosso objeto de discussão neste artigo.

As células-tronco embrionárias possuem a característica totipotente, ou seja, a capacidade de se especializar em qualquer tipo de célula do organismo. Já as células-tronco hematopoiéticas ou adultas possuem característica pluripotente; são capazes de gerar os tipos celulares que compõem o tecido ou órgão específico onde estão situadas, sendo progressivamente mais diferenciadas e com menor capacidade proliferativa em relação às células-tronco embrionárias. Até recentemente, apenas a MO era utilizada como fornecedora de células-tronco hematopoiéticas, mas outras fontes como, por exemplo, o sangue de cordão umbilical, possuem também células transplantáveis, porém, em número limitado (VIGORITO *et al*, 2009).

Pesquisas atuais estão comprovando a pluripotencialidade das células-tronco adultas, colocando em questão o uso medicinal dessas células em bases totalmente novas. A utilização desse tipo de célula elimina não apenas as questões ético-religiosas envolvidas no emprego das células-tronco embrionárias, mas também os problemas de rejeição imunológica, já que células-tronco do próprio paciente podem ser usadas para regenerar seus tecidos ou órgãos lesados.

O primeiro relato de uso de células de sangue de cordão umbilical humano em transplante foi em 1988, pela doutora Eliane Gluckman, do Hospital Saint-Louis em Paris, França. Gluckman e colaboradores utilizaram o sangue de cordão umbilical da irmã de um paciente com anemia de Fanconi para realizar o transplante, o qual foi um sucesso. A partir daí, o sangue de cordão umbilical tem sido utilizado como uma excelente fonte de células-tronco hematopoiéticas para transplante em pacientes que não apresentam doadores com HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) compatíveis na família.

Com o avanço cada vez maior da utilização das células-tronco hematopoiéticas em terapias, torna-se importante a criação de bancos de sangue de cordão umbilical e placentário para realização da coleta, processamento e criopreservação desse material.

Discussão

As células-tronco adultas, dentre as quais se encontra o grupo das células-tronco hematopoiéticas, são pluripotentes e são encontradas em vários tecidos, como medula óssea, sangue, fígado, polpa dentária de crianças e adultos, e

também no cordão umbilical e na placenta. É a partir dessas células que ocorre a formação da porção celular do sangue, através do processo de hematopoiese, onde as células-tronco são capazes de seguir qualquer linhagem hematológica, seja mielóide ou linfóide. Sendo assim, as células-tronco possuem um papel fundamental em nosso organismo (VERFAILLIE, 2002).

Segundo Gluckman, Rocha & Chevret (2001), as primeiras aplicações terapêuticas de células-tronco ocorreram com o uso de células pluripotentes derivadas de tecidos adultos. Em todo o mundo, milhares de amostras de sangue do cordão já foram transplantadas tanto em adultos quanto em crianças. O sucesso desses transplantes é a validação da capacidade terapêutica das células-tronco do sangue do cordão e os benefícios do uso destas células são inúmeros. Entre eles destacam-se:

- A total compatibilidade das células-tronco armazenadas com o indivíduo de quem elas foram colhidas, sendo que a compatibilidade provável em uma população pode variar de 1/10.000 a 1/40.000;
- Uma vez colhidas e congeladas, as células não sofrerão agressões ambientais como radiação, agentes químicos e contatos virais, estando assim protegidas e prontamente disponíveis para o uso;
- As células do sangue do cordão umbilical possuem idade biológica do neonato. Sendo assim são células com grande capacidade de regeneração e proliferação;
- Inexistência de risco ao doador e baixo risco na transmissão de doenças.

Por possuir diversos benefícios, as células-tronco hematopoiéticas já estão sendo utilizadas em terapias para o tratamento de diversas doenças, tais como: distúrbios do sistema imune herdados (p.ex., Síndrome de Chediak-Higashi), leucemias, alguns tipos de cânceres (p.ex., Linfoma de Hodgkin e Mieloma Múltiplo) e distúrbios proliferativos de células sanguíneas (anemias e anomalias plaquetárias herdadas). (PERLOW, 2003)

Apesar das inúmeras vantagens das células-tronco, muitos especialistas ainda apontam algumas questões que devem ser melhor estudadas, bem como limitações que devem ser levadas em consideração. Primeiramente, o sangue do cordão umbilical armazenado serve como um seguro apenas durante o tempo em que as células congeladas são ainda viáveis (GUNNING, 2005). Ainda, o transplante com células-tronco hematopoiéticas é recomendado apenas para pessoas que pesem até 50 kg. Acima desse peso, a quantidade de células fornecidas pelo cordão torna-se insuficiente para reconstituir alguns tecidos doentes, como a medula óssea (WADLOW & PORTER, 2002).

Finalmente, em algumas situações médicas não se recomenda o transplante em uma pessoa com suas próprias células-tronco (tratamento autólogo). A utilização autóloga torna-se muito improvável em uma criança portadora de

câncer ou de uma imunodeficiência, dado que estes males são tidos como de base genética (THOMAS, 1995).

Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário

O sucesso do uso das células do sangue de cordão umbilical em transplantes culminou com a necessidade de armazenamento dessas células. Atualmente existe uma grande exposição na mídia sobre os inúmeros benefícios que as células do sangue de cordão umbilical podem proporcionar para o tratamento e cura de diversas doenças. Entretanto, muitas pessoas não possuem conhecimento de quais são os tipos de bancos de sangue de cordão e quais são suas diferenças (ADAMSON, 1997).

Os Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) são organizações presentes em todo o mundo, podendo ser públicas ou privadas (ENGELFRIET *et al*., 1998).

O primeiro BSCUP público foi estabelecido em 1993 pelo Doutor Pablo Rubinstein no *New York Blood Center,* Estados Unidos. Esse procedimento encorajou o estabelecimento de outros BSCUP em diversas partes do mundo e o número de transplantes utilizando células do sangue de cordão aumentou surpreendentemente nos últimos anos (PRANKE, 2004).

Em 1997, foi criado o BSCUP público Eurocord, programa da Comunidade Européia de subvenção às pesquisas com sangue de cordão. Este programa buscava analisar os dados de todos os transplantes feitos na Europa. Desta forma, os resultados foram publicados na *New England of Medicine*, relatando o sucesso dos estudos e conseqüentemente proporcionando a criação de novos centros de sangue de cordão umbilical. Em 1998, dentro do Eurocord, foi criado o grupo Netcord visando estabelecer critérios precisos para estes tipos de bancos. O Netcord se tornou responsável pela padronização do congelamento do sangue de cordão, critérios de qualidade, procedimentos de coleta e critérios de inclusão e exclusão no processo de doação (GLUCKMAN & FRANCO, 2000).

Desde 1998, quando o Brasil, através de centros de pesquisas e hemocentros, passou a dominar a técnica de transplante de medula óssea que utiliza o sangue de cordão umbilical, a Sociedade Brasileira de Medula Óssea tomou a iniciativa de criar um grupo capaz de estruturar uma rede nacional pública de bancos de sangue de cordão umbilical. Em agosto de 2000, uma portaria do Ministério da Saúde regulamentou os primeiros padrões e procedimentos dessa rede. Desta forma, no dia 24 de setembro de 2004 foi criada a primeira rede pública de BSCUP do Brasil, recebendo o nome BrasilCord (BARBIERI, 2009).

Atualmente participam da rede as seguintes instituições: Hemocentro de Ribeirão Preto, Hospital Albert Einstein, Hospital das Clínicas e Unicamp localizados no Estado de São Paulo, Instituto Nacional do Câncer no Estado do Rio de Janeiro

e Universidade Federal do Paraná. Todas essas instituições deverão cadastrar as suas unidades no Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (Redome). Os pacientes com indicações para transplante de medula óssea também deverão estar cadastros no Redome. Dessa forma, será possível fazer um cruzamento de informações visando identificar o doador compatível (Ibidem). Esses bancos garantirão que 100% das diversidades biogenéticas dos brasileiros estejam representadas. Isto implica que quase a totalidade dos pacientes poderá encontrar no Brasil doadores compatíveis para a realização de transplante de medula óssea (HOSPITALAR, 2009).

O primeiro banco de sangue de cordão umbilical e placentário privado licenciado foi o CorCell, localizado na Pensilvânia – Estados Unidos, em 1996 (CORCELL, 2009). Atualmente, existem mais de 100 bancos de sangue distribuídos pelo mundo. Já o primeiro BSCUP privado do Brasil foi construído em abril de 2001 pela empresa Cryopraxis Criobiologia Ltda. localizada no Pólo de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Entre os BSCUP públicos e privados existem algumas diferenças. Os bancos públicos trabalham com transplantes heterólogos, ou seja, a mãe doa o sangue de cordão umbilical para um receptor não relacionado. Já os bancos privados trabalham com transplantes autólogos, onde o sangue de cordão umbilical é utilizado para o próprio indivíduo. Entretanto, mesmo nos bancos privados, desde que exista autorização dos responsáveis, o sangue congelado poderá ser utilizado no tratamento de parentes, uma vez que a compatibilidade genética para o procedimento seja estabelecida (GLUCKMAN, ROCHA & CHASTANG, 1997).

Outra diferença é que os bancos privados visam o lucro, sendo necessário o pagamento de uma taxa única para os procedimentos de registro, coleta e processamento, além de taxas periódicas para a criopreservação do sangue de cordão. Os bancos públicos por sua vez, não têm fins lucrativos e são financiados por instituições governamentais e por doações privadas (FISK *et al.*, 2005).

Armazenar em uma clínica particular possui a vantagem de eliminar a hipótese de eventualmente ter que se recorrer aos bancos públicos, onde dificilmente se encontra uma amostra compatível, coexistindo com a burocracia e a lentidão no processo de doação. Entretanto, para minimizar as desvantagens dos bancos públicos em relação aos privados, algumas medidas poderiam ser adotadas, tais como fazer com que as centrais de transplantes sejam totalmente controladas por uma instituição pública, principalmente as que possuem as maiores filas de pessoas aguardando atendimento; e investir em campanhas públicas incentivando a doação de medula óssea e de sangue de cordão umbilical.

Procedimentos para Armazenamento do Sangue de Cordão Umbilical

Os bancos de sangue de cordão umbilical envolvem um número de passos que exigem aderência às boas práticas laboratoriais e de produção para assegurar que sangue de cordão eficaz e seguro possa ser oferecido em centros de transplantes. O recrutamento e a seleção de doadores, testes para doenças transmissíveis e outros aspectos laboratoriais, assim como a validação de técnicas para armazenamento, visam à segurança das doações nesse tipo de banco de sangue. Processamentos, criopreservação e procedimento de armazenamento foram otimizados para conservar a qualidade e a quantidade das células-tronco hematopoiéticas (WARWICK & ARMITAGE, 2004).

De acordo com as normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2009), existem determinados testes laboratoriais, realizados utilizando o sangue materno, necessários para que possa ser realizada a coleta do sangue do cordão umbilical. Tais exames deverão ser realizados no período de até 48 horas após o parto e, ainda repetidos entre três e seis meses iniciais de armazenamento. Os testes laboratoriais são: HIV I e II, HTLV I e II, Hepatites B e C, Citomegalovírus, VDRL, Chagas, Toxoplasmose, dosagem de alanina aminotransferase, eletroforese de hemoglobinas e dosagem de hemoglobina A2.

Procedimento de coleta

Para que a coleta do sangue de cordão umbilical e placentário seja realizada corretamente, todos os materiais utilizados no procedimento deverão estar dispostos de modo a conferir eficiência, praticidade e segurança ao processo. Para atender completamente às normas vigentes, esses materiais devam ser estéreis, apirogênicos, descartáveis e estar registrados ou autorizados para uso pela autoridade sanitária competente (CRYOPRAXIS, 2009).

As gestantes doadoras do sangue de cordão umbilical devem atender critérios específicos, como possuir entre 18 e 36 anos; ter realizado no mínimo duas consultas de pré-natal documentadas; estar com a idade gestacional acima de 35 semanas, no momento da coleta; e não possuir no histórico médico doenças neoplásicas e/ou hematológicas como, por exemplo, anemias hereditárias (BRASIL, 2005).

A coleta do sangue do cordão umbilical é um processo simples, indolor para a mãe e para o recém-nascido, e não os expõem a qualquer espécie de risco. É um procedimento com uma durabilidade de aproximadamente 2 a 4 minutos após o nascimento do bebê, sem interferir nos procedimentos do parto.

O cordão umbilical é inicialmente pinçado e cortado. Em seguida, com a placenta ainda aderida ao útero, o cordão é esterilizado e é inserida uma agulha, conectada a uma bolsa de coleta contendo uma solução anticoagulante CPDA (*Citrate/phosphate/dextrose/adenine*), na veia mais calibrosa do cordão, para a realização da retirada de uma pequena quantidade de sangue, cerca de 70 –

100mL, que permaneceram no cordão e na placenta. O sangue flui para a bolsa por gravidade até que cesse o gotejamento. Nesse processo não há contato com o ar, o que garante total proteção do material coletado contra qualquer tipo de contaminação. Após terminada a coleta, uma amostra de sangue é retirada para análise da quantidade, viabilidade das células e testes sorológicos. As bolsas, após esses procedimentos, são levadas ao banco de sangue de cordão umbilical, onde serão criopreservadas e poderão ficar disponíveis por vários anos para um transplante com receptor compatível (REGIDOR, 1999).

Processamento e criopreservação

Após a coleta do sangue de cordão umbilical, o material é transportado para o laboratório de criopreservação.

Da bolsa inicial são retiradas amostras para realização da contagem de células nucleadas totais. Em seguida, o material é centrifugado para retirada do plasma e o produto celular final é transferido para uma bolsa especial que resiste a temperaturas de até -196°C. Adiciona-se ao produto 25 mL de uma solução criopreservante contendo DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*), albumina humana e solução fisiológica e imediatamente a bolsa é colocadas em um congelador programável controlado por computador (RUBINSTEIN *et al.*, 1995).

Desse modo, as células são congeladas desde a temperatura ambiente, a um decaimento aproximado de -1°C/minuto, até -80°C, o qual faz parte do chamado congelamento programado, que teoricamente garante a manutenção da viabilidade das células-tronco. Após este procedimento que dura aproximadamente 1 hora, a bolsa é transferida para um freezer mantido em nitrogênio líquido, onde será conservada por tempo indeterminado (Ibidem).

Tempo de armazenamento

As datas de validade dos tecidos criopreservados geralmente são de cinco anos, embora estes sejam limites arbitrários e a extensão real do armazenamento possível para muitos tecidos não tenha sido determinada. Até o momento, a mais antiga amostra de células-tronco de sangue do cordão descongelada tinha 15 anos e estava intacta. Sabe-se, porém, que células progenitoras oriundas de medula óssea têm sido estocadas por décadas em bancos internacionais, sob o mesmo regime, sem perda de viabilidade. Por isso, em tese, quando processadas corretamente, as células-tronco podem ficar preservadas por décadas (GUNNING, 2005).

Conclusão

Pesquisas sobre células-tronco estão revelando o conhecimento de como um organismo se desenvolve a partir de uma única célula e como as células saudáveis substituem células danificadas em organismos adultos. As células-tronco

apresentam duas características principais: são indiferenciadas e têm a capacidade de gerar grande variedade de células com diferentes funções.

As células-tronco hematopoiéticas são encontradas nos adultos em tecidos específicos do corpo, incluindo o sangue e a medula óssea. Outra fonte desse tipo celular é o sangue do cordão umbilical e da placenta, sendo que essas células possuem uma vantagem maior sobre as células-tronco embrionárias ou adultas da medula óssea, devido a sua facilidade de obtenção. Pode ser coletado no momento do nascimento sem oferecer nenhum risco para a mãe ou para o bebê.

O sucesso do uso das células-tronco do sangue de cordão umbilical em transplantes culminou com a necessidade de armazenamento dessas células. Com isso foram abertos bancos de sangue de cordão umbilical que podem ser públicos ou privados, responsáveis pelo registro, coleta, processamento e criopreservação do material. Porém, deve ser melhor discutido como ocorrerá a convivência entre bancos públicos e privados. Os bancos de sangue de cordão umbilical públicos possuem a principal vantagem de disponibilidade, gratuita a qualquer cidadão que comprove sua compatibilidade com o material armazenado.

Entretanto, como os bancos públicos exigem grandes investimentos para sua abertura e manutenção, diversas pessoas não acreditam que os serviços possam ser mantidos em perfeita ordem. Desta forma, muitas pessoas que possuem condições para contratar os serviços de bancos privados preferem armazenar o sangue de cordão de seus filhos nestas instituições para que, em caso de necessidade futura, possuam a garantia da utilização do material coletado sem morosidade.

Referências Bibliográficas

1. ADAMSON, J. W. Cord blood stem cell banking and transplantation. *Stem Cells*. v. 15, suppl. 1, p. 59-61, 1997.
2. BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria Ministerial nº. 903/GM de 16/08/2000. Disponível em: < http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/PORT2000/GM/GM-903.htm> Acesso em: 08/09/2009.
3. BARBIERI, J. BrasilCord favorece investimentos para bancos de sangue, 2009. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/celulas/07.shtml> Acesso em 08/09/2009.
4. BRASIL, Ministério da Saúde- INCA - Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, 2009. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID= 124> Acesso em 03/08/2009.

5. CORCELL. About Corcell. 2005. Disponível em: <http://www.corcell.com> Acesso em 18/08/2009.
6. CRYOPRAXIS. Dúvidas, 2009. Disponível em: <http://www.cryopraxis.com.br/index.php?option=com_wrapper&Itemid=92 > Acesso em 08/09/2009.
7. ENGELFRIET, C. P. *et al*. Use of cord blood progenitor cells as an alternative for bone marrow transplantation. *Vox Sanguinis.* v. 75, p. 156-172, 1998.
8. FISK, N. M. *et al*. Can Routine Commercial Cord Blood Banking Be Scientifically and Ehtically Justified? *The PloS Medicine Debate*. v. 2, nº. 2, p. 87-90, 2005.
9. GLUCKMAN, E.; ROCHA, V.; CHEVRET, S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplant. *Transfusion Clinique et Biologique*. v. 8, nº 3, p. 146-154, 2001.
10. GLUCKMAN, E.; FRANCO, L. Umbilical cord blood transplants. *Current Opinion in Hematology*. v. 7, nº. 6, p. 353-357, 2000.
11. GLUCKMAN, E. G.; ROCHA, V.; CHASTANG, C. Use of cord blood cells for banking and transplant. *The Oncologist*. v. 2, nº. 5, p. 340-343, 1997.
12. GUNNING, J. Umbilical cord cell banking- implications for the future. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 207, p.538-543, 2005.
13. HOSPITALAR. Brasil realiza transplante inédito com sangue de cordão umbilical, 2009. Disponível em: <http://www.hospitalar.com/noticias/not1935.html> Acesso em: 01/09/2009.
14. PERLOW, J. H. Cord blood banking: an OB's perspective, 2003. Disponível em: <http://www.cryo-cell.com/resources/cord_blood_banking_an_obs_perspective. pdf> Acesso em 18/10/2005.
15. PRANKE, P. A importância de construir bancos de sangue de cordão umbilical no Brasil. *Ciência e Cultura*. v. 56, nº. 3, p. 39-40, 2004.
16. REGIDOR, C. et. al. Umbilical cord blood banking for unrelated transplantations: evaluation of cell separations and storage methods. *Experimental Hematology*, v. 27, p. 380-385, 1999.
17. RUBINSTEIN, P. *et al*. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Medical Sciences.* v. 92, p. 10119-10122, 1995.
18. THOMAS, E.D. Hematopoietic stem cell transplantation. Science & Medicine. v. 2, nº 5, p. 38, 1995.
19. VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology*. v. 12, nº. 11, p. 502-508, 2002.
20. VIGORITO, AC; SOUZA, CA. Transplante de células-tronco hematopoéticas e a regeneração da hematopoese. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v.2009.

21. WADLOW, R. C.; PORTER, D. L. Umbilical cord blood transplantation: where do we stand?. *Biology of Blood and Marrow Transplantations*. v. 8, nº 12, p. 637-647, 2002.
22. WARWICK, R.; ARMITAGE, S. Cord blood banking. *Best Practice e Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. v. 18, nº. 6, p. 995-1011, 2004.